

# Спонтанный апоптоз лимфоцитов больных раком яичников

Антонеева И.И.<sup>1</sup>, Бойчук С.В.<sup>2</sup>

## Spontaneous apoptosis of lymphocytes of ovary cancer patients

Antoneyeva I.I., Boichuk S.V.

<sup>1</sup> Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск

<sup>2</sup> Казанский государственный медицинский университет, г. Казань

© Антонеева И.И., Бойчук С.В.

В настоящей работе приведены результаты изучения механизмов спонтанного апоптоза лимфоцитов (Лф) периферической крови доноров и больных раком яичников (РЯ). В качестве маркеров апоптоза Лф использовали динамику изменения величины митохондриального потенциала (МП), уровня экспрессии фосфатидилсерина (ФС), а также фрагментации ДНК. Изучаемые параметры апоптоза оценивали методом проточной цитофлуориметрии. В Лф больных РЯ при инкубации в среде RPMJ-1640 фрагментация ДНК наблюдалась в большей степени и на более ранних сроках по сравнению с Лф доноров. Достоверно выражено падение МП и повышение уровня экспрессии ФС. Результаты свидетельствуют о повышенной реактивности митохондрий Лф больных РЯ и, как следствие, о пониженной их устойчивости к процессам спонтанного апоптоза.

**Ключевые слова:** рак яичников, лимфоциты, апоптоз.

Results of the study of the spontaneous apoptosis mechanisms of peripheral blood lymphocytes of ovary cancer (OC) patients are presented in the article. Dynamics of mitochondrial potential (MP) change, level of phosphatidylserine (PS) expression and DNA fragmentation were used as apoptosis markers. These parameters were estimated by flow cytometry. During the incubation process, DNA fragmentation in OC patient lymphocytes were more intensive and observed during earlier stages than those in donor lymphocytes. Also, reliable decrease of MP and increase of PS expression level were observed. The study results revealed increased reactivity of mitochondrial lymphocytes in OC patients and as a result, decreased resistance to spontaneous apoptosis processes.

**Key words:** ovary cancer, lymphocytes, apoptosis.

УДК 618.11-006.6:616.155.32-091.818

### Введение

Современная концепция возникновения и развития опухолей основывается на признании онкогена в качестве общего звена канцерогенеза любого происхождения. При этом все этапы развития неоплазмы рассматриваются с единой точки зрения: от активации онкогена до появления трансформированной мутантной клетки с новым фенотипом. Механизмы реализации канцерогенных влияний весьма разнообразны и в деталях не изучены, однако сопоставление динамики распространения канцерогенных факторов во внешней среде с уровнем онкозаболеваемости убедительно показывает, что восприимчивость к раку не абсолютная, очевидно наличие системы защиты от возникновения злокачественных опухолей.

Поиск противораковой защиты в пределах иммунной системы организма начался с классических работ И.И. Мечникова, А.А. Богомольца и реализовался в стройной теории иммунологического надзора Ф. Бернета.

Согласно последней, иммунологический надзор осуществляется сенсibilизированными Т-клетками — основными эффекторами клеточного звена иммунитета.

Однако к настоящему времени ряд иммунологов пришли к выводу о том, что количественные и функциональные изменения субпопуляций лимфоцитов не отражают состояния противоопухолевой резистентности [1, 8].

Апоптоз представляет собой процесс программированной клеточной гибели. При этом уничтожение клеток не сопровождается повреждением окружающих тканей. По механизму апоптоза из организма элиминируются стареющие клетки, ареактивные лимфоциты в процессе их дифференцировки, происходит циклическая регрессия и возрастная инволюция ряда тканей и органов [2]. Таким образом, в норме назначение апоптоза состоит в сохранении постоянства численности клеток, их соотношения и в удалении генетически дефектных клеток. Известно множество экзогенных и эндогенных факторов, воздействие которых способно индуцировать

или ингибировать апоптоз. Онкогены относят к эндогенным индукторам апоптоза.

Таким образом, способность опухолей уходить от иммунологического контроля организма может быть связана с их апоптогенным действием на лимфоциты крови.

## Материал и методы

Объектом исследования явились лимфоциты (Лф) периферической крови 7 здоровых женщин и 10 первичных больных раком яичников (РЯ), имеющих III—IV клинические стадии заболевания (по FIGO). Клетки выделяли центрифугированием в градиенте плотности перколла («Pharmacia», Швеция) с предварительным осаждением эритроцитов 4,5%-м раствором декстрана Т-500 («Loba Chemie»).

Клетки, выделенные с интерфазы 1.007, культивировали в 24-луночных пластиковых планшетах («Costar») в среде RPMJ-1640 («Flow») с добавлением L-глутамина («Ligma»), Нерес («Sigma», США), 10%-й эмбриональной телячей сыворотки («Sigma», США), интерлейкина-2 (2 074 в 1 мл) («Sigma», США) и антибиотиков при температуре 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>) («Joan») в течение 1—8 сут. Клетки инкубировали с моноклональными антителами к Fas-рецептору («Phar Mingen»).

Оценку апоптоза Лф осуществляли методом проточной цитофлуориметрии на приборе «FacsCan» («Becton Dickinson») по следующим параметрам.

1. При окрашивании ДНК Лф с помощью гипотонического раствора пропидия йодида («Sigma», США), содержащего 0,1% тритона X-100 и 0,15 цитрата натрия, клетки предварительно фиксировали 70%-м этанолом. Подсчитывали процент клеток, обнаруживаемых в гиподиплоидной (M<sub>2</sub>) зоне гистограммы, располагающейся левее основного пика (M<sub>3</sub>), соответствующего диплоидным клеткам. Известно, что именно в гиподиплоидной зоне локализуются клетки, подвергшиеся апоптозу. Некротические клетки располагались в зоне M<sub>1</sub> и отсекались от анализа курсором. Клетки зоны M<sub>4</sub> отражали пролиферацию Лф. Регистрацию результатов проводили на втором детекторе (FL2) флуоресценции [7].

2. Изменения величины митохондриального потенциала (МП) измеряли с помощью флуорохромов DIOC<sub>6</sub> («Sigma», США) [3], CMXRos («Molecular Probes») [4]. Оценку величины МП по флуоресценции CMXRos проводили соответственно на втором (FL2) и первом (FL1) детекторах флуоресценции. В качестве контроля уровня флуоресценции флуорохромов, используемых для оценки величины МП, клетки инкуби-

ровали 15 мин с m-CLCCP («Sigma», США) (150 мкмоль). Данное вещество является специфическим индуктором, снижающим величину МП.

3. Эспрессию фосфатидилсерина (ФС) определяли при помощи флуорохрома MC540 («Sigma», США). Регистрацию результатов проводили на втором детекторе (FL2) флуоресценции [6].

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием прикладных программ Statistica 6.0. Достоверность различия данных определялась с применением непараметрического U-критерия Манна—Уитни.

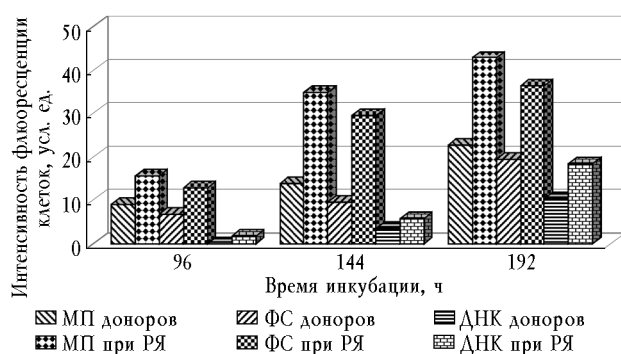
## Результаты и обсуждение

Культивирование Лф крови здоровых и больных раком яичников в среде RPMJ-1640 вызывало со временем гибель клеток. При этом одна их часть погибала в результате некроза, другая — посредством апоптоза. Показано, что имело место снижение величины МП, составившее  $9,10 \pm 1,96$  через 72 ч;  $13,20 \pm 1,85$  — через 144 ч и  $22,80 \pm 2,16$  — через 192 ч инкубации. Практически одновременно на поверхности Лф появлялся ФС, экспрессия которого в процессе инкубации статистически достоверно нарастала и составила  $6,80 \pm 0,62$  — через 72 ч,  $9,60 \pm 1,21$  — через 144 ч и  $19,50 \pm 1,45$  через 192 ч инкубации. Достоверное увеличение уровня фрагментации ДНК Лф начиналось существенно позже — со 144 ч ( $3,60 \pm 0,89$ ) и к 192 ч достигало величины  $10,40 \pm 1,19$ .

Таким образом, снижение величины МП и появление ФС на поверхности Лф происходит в первую очередь и практически одновременно. Фрагментация ДНК Лф начинается несколько позже.

Вышеуказанные признаки апоптоза имели место в Лф доноров. У больных РЯ снижение МП было достоверно более выражено и составило через 72 ч инкубации  $15,50 \pm 1,24$  ( $p = 0,0009$ ); через 144 ч —  $34,50 \pm 1,67$  ( $p = 0,0006$ ) и через 192 ч инкубации —  $42,80 \pm 1,37$  ( $p = 0,0006$ ). Экспрессия ФС на поверхности Лф больных РЯ была также достоверно более выраженной, нежели на Лф доноров: показатели составили через 72 ч инкубации  $12,80 \pm 0,88$  ( $p = 0,0006$ ); через 144 ч —  $29,70 \pm 1,60$  ( $p = 0,0006$ ) и через 192 ч —  $36,50 \pm 1,32$  ( $p = 0,0006$ ). Напротив, увеличение уровня фрагментации ДНК в этих лимфоцитах началось раньше, чем в Лф доноров, и уже через 72 ч инкубации составил  $1,8 \pm 0,8$  ( $p = 0,0006$ ); к 144 ч он возрос до  $5,8 \pm 0,7$  ( $p = 0,001$ ) и к 192 ч составил  $18,4 \pm 2,4$  ( $p = 0,0006$ ).

Таким образом, как в Лф доноров, так и больных РЯ обнаружена четкая обратная зависимость между величиной МП и уровнем экспрессии ФС. Показано, что Лф с нормальной величиной МП практически не экспрессируют ФС на своей поверхности. Спонтанное снижение величины МП Лф предшествует появлению ФС на клеточной поверхности. Более того, экспрессия ФС наблюдается только на клетках со сниженным МП, описанные изменения имеют место как в Лф доноров, так и больных раком яичников. Однако у последних эти изменения существенно и достоверно более выражены (рисунок).



Изменения митохондриального потенциала, уровня экспрессии фосфатидилсерина и уровня фрагментации ДНК лимфоцитов доноров и больных раком яичников в процессе инкубации

Как следует из приведенных выше данных, изменение величины МП является наиболее ранним и обязательным признаком спонтанного апоптоза Лф доноров и больных РЯ. Возможно, вещества, выделяющиеся из митохондрий в результате снижения их МП, могут участвовать в последующей деградации ДНК и элиминации клеток, подвергающихся апоптозу. Суще-

## Экспериментальные и клинические исследования

ствует точка зрения [5], согласно которой апоптотическая гибель клетки может наступать в результате усиления на ее поверхности экспрессии специфических молекул. Полагают, что освобождающиеся из митохондрий ДНК могут активизировать ФС — транслоказы или вызывать протеолиз компонентов цитоскелета. В результате ФС, удерживающийся на внутренней поверхности мембраны, может транслоцироваться на наружную поверхность клетки. Кроме того, показано [3], что блокада митохондриальной АТФазы также индуцирует экспрессию ФС на поверхности Лф.

## Заключение

Таким образом, проведенное исследование дает основание говорить о пониженной устойчивости Лф больных РЯ к процессам спонтанного апоптоза, проявляющейся в ускорении фрагментации их ДНК. Это может быть результатом большого (по сравнению с Лф доноров) снижения МП, вследствие чего в цитоплазму выбрасываются апоптогенные факторы, запускающие каскад реакций, приводящих к упорядоченной деградации ДНК и экспрессии ФС на поверхности Лф, приводящих к гибели и элиминации клеток.

## Литература

1. Билинский Б.Т., Володько Н.А., Шпарык Я.В. Иммунологические механизмы естественной противоопухолевой резистентности человека. Львов, 1989. 64 с.
2. Новиков В.С. Программированная клеточная гибель. СПб., 1996.
3. Castedo M., Hirsch T., Susin S. et al. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis // J. Immunol. Meth. 1996. V. 157. P. 512—521.
4. Macho A., Decandin D., Castedo M. et al. Chloromethyl-X-Rosamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis // Cytometry. 1996. V. 25. P. 333—340.
5. Martin S.J., Brein C.A., Nishiora W.K. et al. Proteolysis of fodrin (non Erythroid spectrin) during apoptosis // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 6425—6429.
6. Mower D.A., Peckham D.W., Jelera V.A. et al. Decreased membrane phospholipids packing and decreased cell size precede DNA cleavage in mature mouse B cell apoptosis // J. Immunol. 1994. V. 152. P. 4832—4842.
7. Nicoletti J., Migliorati J. Rapid and simple method of measurement of nuclear apoptosis // J. Immunol. Meth. 1991. V. 139. P. 271—279.
8. Phehn R.T. The immune reaction as a stimulator of tumor growth // Science. 1972. V. 176. P. 170—171.

Поступила в редакцию 20.09.2005 г.